Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr.med. H. Franke

DER EINFLUSS VON PIRACETAM AUF DEN GEHALT AN CYCLISCHEM ADENOSIN-3',5'-MONOPHOSPHAT IN RESEZIERTEM MENSCHLICHEN HIRNGEWEBE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der

Hohen Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Rudolf Fritsch

aus Rothenbuch

Würzburg, den 17. Juli 1981

Aus der Medizinischen Poliklinik der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr.med. H. Franke

DER EINFLUSS VON PIRACETAM AUF DEN GEHALT AN CYCLISCHEM ADENOSIN-3',5'-MONOPHOSPHAT IN RESEZIERTEM MENSCHLICHEN HIRNGEWEBE

Inaugural-Dissertation
verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Rudolf Fritsch
aus Rothenbuch

Würzburg, den 17. Juli 1981

Referent: Professor Dr.med. H.-J. Pusch

Korreferent: Professor Dr.med. H. Franke

Dekan: Professor Dr.med. K.-H. Wulf

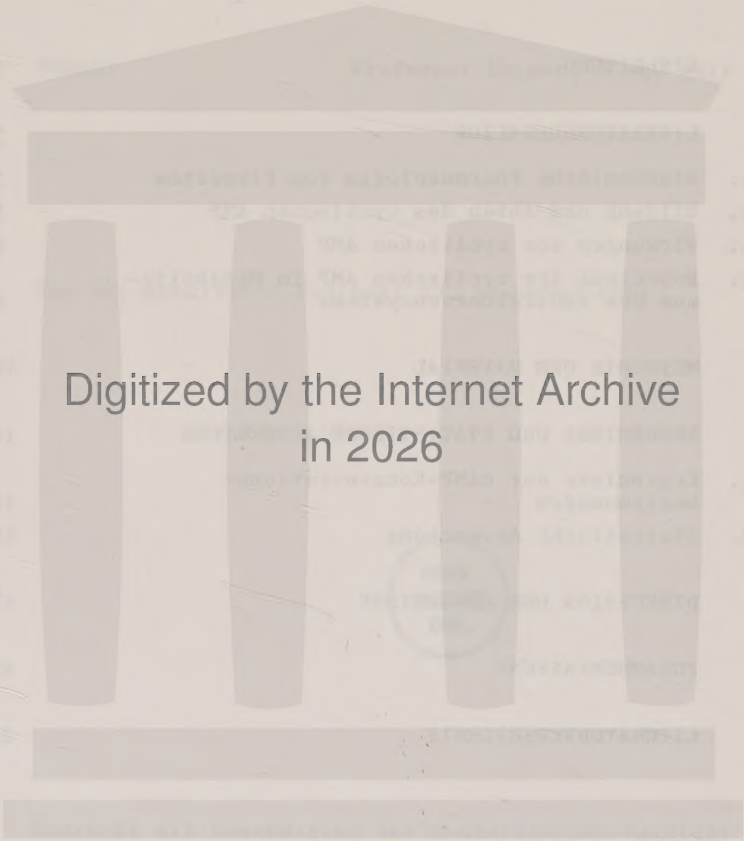
Tag der mündlichen Prüfung: 12. November 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Würzburg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	LITERATURÜBERBLICK	3
2.1.	Biochemische Pharmakologie von Piracetam	3
2.2.	Bildung und Abbau des cyclischen AMP	5
2.3.	Wirkungen des cyclischen AMP	6
2.4.	Bedeutung des cyclischen AMP im Metabolismus des Zentralnervensystems	8
3.	METHODIK UND MATERIAL	10
4.	ERGEBNISSE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG	12
4.1.	Ergebnisse der cAMP-Konzentrationsbestimmungen	12
4.2.	Statistische Auswertung	15
5.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	17
6.	ZUSAMMENFASSUNG	21
7.	LITERATURVERZEICHNIS	22



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543512_0081

1. EINLEITUNG

Piracetam ist eine hirnstoffwechselaktive Substanz, die vor allem durch zwei pharmakologische Wirkungen charakterisiert ist: Aktivierung der Hirnfunktion und Schutz des Gehirns gegen bestimmte Schädigungen (11, 26).

Das Besondere an Piracetam ist seine selektive Wirkung im Bereich des Großhirns, dessen Kortex für höhere mentale Funktionen (Bewußtsein, Aufmerksamkeit, Gedächtnis) verantwortlich ist (36, 37).

Piracetam beschleunigt die Gedächtnisbildung, erhöht die Resistenz gegenüber Hypoxie, verkürzt die zerebrale Erholungszeit nach Schädigungen, verstärkt die Zusammenarbeit der Hemisphären und verbessert nervöse Vorgänge in kortikalen Bahnen (10, 18, 19, 32, 60).

Piracetam wird deshalb bei Krankheitszuständen eingesetzt, bei denen eine Beeinträchtigung der geistigen Leistungsfähigkeit als Folge einer Störung des Hirnstoffwechsels vorliegt, wie im Verlauf von zerebralen Durchblutungsstörungen (23), bei zerebraler Arteriosklerose (3, 12, 38, 51), frühkindlichen Hirnschädigungen (53, 57, 59), bei Schädel-Hirn-Verletzungen (1, 43, 48) oder ausgelöst durch Intoxikationen wie Alkoholismus (4, 58).

Zahlreiche klinische Untersuchungen, darunter Prüfungen nach der Doppelblindmethode, bestätigen die Wirksamkeit von Piracetam (26).

Die biochemische Wirkung von Piracetam besteht in der Steigerung des Energiestoffwechsels der Nervenzelle mit Erhöhung der Turnover-Rate von ATP (ATP-Rotation), so daß mehr Energie für die wichtigen energieverbrauchenden Prozesse (Synthese von RNS und Proteinen, Membranpotential, Leitung nervöser Impulse) zur Verfügung steht (20).

Die biochemischen Vorgänge, die der Piracetam-Wirkung zugrunde liegen, sind jedoch größtenteils noch unbekannt. Dabei interessiert der Einfluß von Piracetam auf die cyclischen Nukleotide des Gehirns.

Die cyclischen Nukleotide cAMP (cyclo-3',5'-Adenosinmonophosphat) und cGMP (cyclo-3',5'-Guanosinmonophosphat) haben eine wichtige Funktion bei der Steuerung des Zellstoffwechsels. Die Reaktionszellen besitzen außen in ihren Plasmamembranen spezifische Rezeptoren der Adenylcyclase, die jeweils nur auf spezifische Substrate (primäre Messenger) ansprechen und die Adenylcyclase aktivieren. An der Innenseite setzt daraufhin die Synthese von cAMP aus ATP ein. Die Bildung von cGMP erfolgt im Prinzip in ähnlicher Weise. Diese beiden cyclischen Nukleotide können als sekundäre Messenger vielfältige Folgereaktionen, wie z.B. Enzymaktivierungen und Permeabilitätsbeeinflussungen, auslösen. Die entstandenen Produkte können sowohl innerhalb der Zelle wirken oder als tertiäre Messenger weitere Zielgewebe beeinflussen (44).

Als SUTHERLAND 1958 entdeckte, daß die Wirkung von Adrenalin und Glucagon auf den Stoffwechsel durch das cAMP vermittelt wird, führte dies zu der Erkenntnis, daß "cAMP in allen Lebensformen auftritt und eine Schlüsselrolle in der Steuerung biologischer Prozesse spielt" (54).

Auf der Suche nach weiteren biochemischen Grundlagen der Wirkung von Piracetam sollte deshalb der Einfluß auf den cAMP-Gehalt in reseziertem menschlichen Hirngewebe untersucht werden.

2. LITERATURÜBERBLICK

2.1. Biochemische Pharmakologie von Piracetam

Piracetam ist eine nootrope Substanz. Als nootrop bezeichnet man Stoffe, die den zerebralen Stoffwechsel verbessern und damit die Leistungsfähigkeit des Gehirns steigern. Der biochemische Weg, auf dem dies geschieht, ist dabei nicht festgelegt. Diese Substanzen sollten weder vasodilatatorisch wirken, noch vasokonstriktiv, die Blut-Hirn-Schranke unter physiologischen wie auch pathologischen Bedingungen passieren können, nicht die normale Basis-Aktivität im EEG verändern, nachweisbar metabolische Aktivitäten im Gehirn entwickeln, Sauerstoff- und Glucoseumsatz ankurbeln, den Lactat/Pyruvat-Quotienten verkleinern, einen anhand klinischer Studien quantifizierbaren Effekt auf den zerebralen Stoffwechsel haben und schließlich gut verträglich sein (27). Pharmaka, die diese Kriterien beanspruchen, sind Dihydroergotoxine, Pyritinol, Centrophenoxin und Piracetam; das letztgenannte ist schon seit langem bekannt, gewinnt jedoch immer mehr an Interesse.

Einerseits beschäftigt man sich mit den pharmakologischen Eigenschaften von Piracetam; gelingt es, seine Wirkmechanismen zu entschlüsseln, hofft man, auch über die Hirnfunktionen mehr zu erfahren. Andererseits entdeckt man immer wieder neue Indikationen für den Einsatz der Substanz.

Piracetam, 2-Oxo-pyrrolidin-1-acetamid, ähnelt chemisch der Gamma-Amino-Buttersäure (GABA). Trotz dieser strukturellen Verwandtschaft mit GABA wirkt Piracetam nicht wie diese als inhibitorischer Neurotransmitter, sondern es greift - wie dies von einer nootropen Substanz gefordert wird - in metabolische Vorgänge im Gehirn ein, und zwar an verschiedenen Stellen (27).

Piracetam reichert sich in Kortex, Zerebellum und Hippokampus an (36, 37). Es gilt als spezifischer Aktivator der Hirnrinde. Die Substanz scheint exzitatorische Neuronen zu stimulieren und damit an der Erregungsübertragung an den Synapsen beteiligt zu sein (64). Piracetam steigert die Aktivität der Phospholipase A_2, eines Schlüsselenzyms für den synaptischen Transfer. Das Enzym spaltet aus Phospholipiden Fettsäuren ab, die die Durchlässigkeit der postsynaptischen Membran für Ionenverschiebungen - und damit die Erregungsübertragung - erleichtern. Aktiviert wird das Enzym im Organismus durch Noradrenalin. Piracetam wirkt gleichsinnig: Es erhöht - wahrscheinlich mittels eines Neurotransmitters - die Phospholipase-Aktivität um rund 50 % und verstärkt, wie man an Katzen zeigen konnte, die elektrische Antwortbereitschaft des Kortex (65, 67).

Piracetam beschleunigt den Einbau von ^{32}P in Inosit- und Cholinphosphatide von Glia und neuronalen Zellen, offenbar auch über eine Stimulation von Noradrenalin und anderen Neurotransmittern. Es fördert also die Synthese von Phosphatidyl-Inosit, welches Ca-Ionen bindet, und beeinflußt damit über Potentialverschiebungen an den Membranen ebenfalls die Vorgänge an der Synapse (66).

Voraussetzung für die Synthese phospho-organischer Verbindungen ist der Umsatz von ATP zu ADP, damit einerseits Energie, andererseits Phosphorsäure bereitgestellt wird. Hier greift Piracetam ebenfalls ein. Es stimuliert die anaerobe Glykolyse und damit die Synthese von ATP. Das Energiepotential der Zelle wird erhöht, und lysosomale Enzymreaktionen sind vermindert. Unter Piracetam nimmt die Einbaugeschwindigkeit von radioaktiv markiertem Phosphat in die zerebralen organischen Phosphatverbindungen zu, und der Stoffwechsel von Phospholipiden und Nukleinsäuren wird angeregt (20, 40).

Untersuchungen mit neuronalen und glialen Fraktionen von Rattenhirnen ergaben, daß Piracetam dosisabhängig die Bildung von Äthanolamin-Plasmalogen - einem wichtigen Bestandteil neuronaler und glialer Membranen - über eine vermehrte Synthese oder Turnover von Cytochrom b_5 steigert (63, 64). Cytochrom b_5 ist ein Ferment der Atmungskette, die das Gehirn mit energiereichem ATP versorgt. Somit greift Piracetam stimulierend in die Atmungskette ein und beschleunigt die Zellatmung.

Parallel zum erhöhten Turnover der Phosphate und Ribonukleinsäuren, die die Proteinsynthese kodieren, vergrößert sich unter Piracetam der Gehalt der Hirnzelle an Polyribosomen, in denen Eiweiß synthetisiert wird. Das Verhältnis von Polyribosomen zu Ribosomen wächst, wobei Ribosomen nicht für die Proteinsynthese zuständig sind (5, 46).

2.2. Bildung und Abbau des cyclischen AMP

Die cyclischen Nukleosidmonophosphate fanden in jüngster Zeit besonderes Interesse wegen ihrer vermutlich zentralen Bedeutung für die Regulation des Zellstoffwechsels. Diese jetzt in vielen Labors vorrangig betriebene Erforschung des cyclischen AMP und GMP wurde stimuliert bzw. ausgelöst durch die grundlegenden Arbeiten von SUTHERLAND und Mitarbeitern, die 1971 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet wurden. Wie auch andere der bisher aufgeklärten biologischen Funktionsprinzipien, z.B. des genetischen Codes, besticht das von SUTHERLAND entwickelte Konzept für die Steuerung des Zellmetabolismus durch seine relative Einfachheit. Demnach stimulieren Hormone oder auch andere "Überträgersubstanzen" eine Mg^{2+} - abhängige enzymatische Reaktion in der Plasmamembranfraktion, wodurch ATP unter Verlust von anorganischem Pyrophosphat in cyclisches AMP

umgewandelt wird. Das Enzym, das diese Reaktion katalysiert, die sog. Adenylcyclase, ist an die Innenseite der Zellmembranen gebunden. An der Außenseite der Membranen befindet sich ein Rezeptor für das wirksame Hormon. Die Adenylcyclase hat somit zwei Untereinheiten: eine katalytische Einheit, die der Adenylcyclase entspricht, und eine regulatorische Untereinheit, die durch den Rezeptor dargestellt wird. Die regulatorische Einheit, der Rezeptor, ist für jedes auf die Adenylcyclase einwirkende Hormon verschieden. Das für den Abbau von cyclischem AMP verantwortliche Enzym ist die Phosphodiesterase, welche die Spaltung von cAMP zu AMP begünstigt (44, 56).

2.3. Wirkungen des cyclischen AMP

Viele Hormone sind hochmolekulare Proteine, welche Zellmembranen nicht oder nur mit Schwierigkeiten passieren können. Sie wirken daher durch eine Aktivierung der Adenylcyclase auf den Stoffwechsel ein, wobei sie nicht in die Zelle eindringen müssen. Neben Adrenalin und Glucagon sind dies z.B. Noradrenalin, Vasopressin, Thyroxin, STH, ACTH, das Parathormon und das luteinisierende Hormon sowie das Thyreotropin und das Melanozyten-stimulierende Hormon. Dadurch wird die Synthese von cAMP gesteigert, das dann seinerseits als "second messenger" wirkt und Einfluß auf bestimmte metabolische Reaktionen nimmt. Da es Membranen nur schlecht passieren kann, wirkt es innerhalb des Kompartimentes, in welchem es gebildet worden ist. Durch Zwischenschaltung von cAMP wird also eine Relaiswirkung ausgeübt und das Hormonsignal hoch verstärkt (14, 44, 54).

SUTHERLAND et al. (56) haben vier Kriterien zur Bestimmung der biologischen Rolle von cyclischem AMP bei Hormonwirkungen aufgestellt. Die Adenylcyclase sollte in

Zellhomogenaten durch ein Hormon, das in unversehrtem Gewebe wirksam ist, stimuliert werden; ein Hormon sollte Änderungen der Konzentrationen an cyclischem AMP im Gewebe stimulieren. Medikamente, welche die Aktivität der Phosphodiesterase hemmen, z.B. Theophyllin und Coffein, sollten die Aktivität der Hormone kontrollieren, welche die Adenylcyclase stimulieren. Die Zugabe von cyclischem AMP zum Gewebe sollte den Hormoneffekt nachahmen.

So beeinflußt das cAMP einen außerordentlich weiten Bereich zellulärer Prozesse, z.B. durch Zunahme der Geschwindigkeitsänderung Lipolyse, Glykogenabbau, Gluconeogenese, Ketogenese, Ionenpermeabilität der Epithelien, Reninproduktion der Niere, Kontraktion des Herzmuskels, HCl-Sekretion der Magenschleimhaut, Amylasefreisetzung der Speicheldrüse, Dispersion der Melaningranula, Insulinfreisetzung im Pankreas und durch Abnahme der Geschwindigkeitsänderung Blutplättchenaggregation und Tumorzellenwachstum in Gewebekulturen (54).

Das cAMP fungiert ferner bei der Regulation der Zellteilung und ist Vermittler bei Entzündungs- und Immunreaktionen von Geweben inklusive der Allergien (33).

Die Wirkung von cAMP kann in verschiedenen Zellen durch zwei andere zelluläre Komponenten, freies Ca^{2+} und verschiedene Prostaglandine, erheblich beeinflußt werden. In manchen Fällen verstärkt Ca^{2+} die Wirkung von cAMP, in anderen hemmt es sie (33).

Der wichtigste durch cAMP beeinflußte Reaktionsmechanismus ist die Phosphorylierung von Proteinen über die Aktivierung eines allgemein als Proteinkinase zu bezeichnenden Enzyms. Die Proteinkinase vermittelt die Übertragung eines Phosphatrestes von ATP auf eine Hydroxylgruppe (Serinrest) des entsprechenden Proteins. Durch die Einführung des Phosphatrestes wird die Ter-

tiärstruktur des Eiweißmoleküls verändert, die Eigenschaften des Enzyms werden dadurch ebenfalls beeinflußt. Z.B. führt die Phosphorylierung der Glykogensynthetase und Phosphorylasekinase in Muskel und Leber zu verminderter Synthese und gesteigertem Abbau von Glykogen. Diese Reaktionskaskade verstärkt den ursprünglichen Hormonreiz (33, 54).

2.4. Bedeutung des cyclischen AMP im Metabolismus des Zentralnervensystems

Es ist wahrscheinlich, daß die cyclischen Nukleotide im Zentralnervensystem eine Mediatorfunktion ausüben. Die Neurotransmitter, doch auch andere adrenerg und muskarinartig cholinerg wirkende Stoffe führen über eine Stimulierung der Adenylcyclase zur vermehrten Bildung der cyclischen Nukleotide, die ihrerseits über die Aktivierung cAMP - abhängiger Proteinkinasen und über die Phosphorylierung von Proteinen bestimmte Funktionen von Nervenzellen beeinflussen. So hat man in jüngster Zeit gefunden, daß cyclische Nukleotide wie das cAMP an den Vorgängen in den Synapsen entscheidend mitbeteiligt sind. Es spielt nicht nur die Proteinphosphorylierung in dem postsynaptischen Neuron eine Rolle, sondern es konnte auch eine Phosphorylierung von Proteinen in der präsynaptischen Membran nachgewiesen werden (35).

Zu den Substanzen, die durch Einwirkung auf die Aktivität der Cyclase die Produktion des cyclischen AMP regulieren, zählen nicht nur Hormone und Neurotransmitter, sondern interessanterweise auch das Nukleosid Adenosin. In vitro konnte durch Gabe von Adenosin die Bildung von cyclischem AMP drastisch gesteigert werden (29, 45). Man spricht dem Adenosin die Funktion eines interzellulär wirksamen neurohumoralen Überträgerstoffes zu. Mit in-vitro - Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß

Adenosin von Hirngewebe freigesetzt wird und daß diese Freisetzung erheblich durch elektrische Stimulation des Gewebes gesteigert werden kann. Die Mengen, die freigesetzt werden, liegen durchaus in einer Größenordnung, die ausreicht, die Produktion von cyclischem AMP signifikant zu erhöhen. Dieser Effekt könnte auf zwei Wegen erreicht werden. Einmal könnte durch die Freisetzung von Adenosin in der Effektorzelle mehr ATP gebildet werden und damit eine größere Menge an Substrat zur Verfügung stehen. Zum anderen gibt es eine Reihe von experimentellen Hinweisen dafür, daß Adenosin auch einen direkten Einfluß auf die Aktivität der Cyclase hat. Es ist sogar zu vermuten, daß eine Reihe von Substanzen bzw. Faktoren, die die Produktion von cyclischem AMP steigern, ihren Effekt mittelbar über eine Freisetzung von Adenosin erzielen. Hier sind z.B. zu nennen: depolarisierende Agenzien wie Veratrin, Dubain oder Kaliumionen, ferner bestimmte psychotrope Drogen, wie z.B. Chlorpromazin oder Chlorimipramin, die alle zu einem gesteigerten Efflux von Adenosin führen (30).

Viele Veröffentlichungen haben über die biologische Bedeutung des cAMP im Zentralnervensystem berichtet (6, 9, 24, 25, 29, 50, 55). Meist handelt es sich dabei um experimentelle Arbeiten mit Tieren und Zellkulturen. Die Publikationen über die cyclischen Nukleotide im menschlichen Gehirn sind jedoch nicht sehr zahlreich (15, 17, 29, 34, 47), wahrscheinlich weil die Forschung infolge der bedeutenden Heterogenität dieses Gewebes ziemlich schwierig ist (47).

Angaben über die Wirkung von Piracetam auf den cAMP-Gehalt in menschlichem Hirngewebe wurden in der Literatur nicht gefunden.

3. METHODIK UND MATERIAL

Für die Untersuchungen wurde Großhirngewebe verwendet, das bei 21 operativen Eingriffen der Neurochirurgischen Klinik der Universität Würzburg entfernt wurde. Die Patienten im Alter von 9 bis 71 Jahren wurden hauptsächlich wegen neuroepithelialer Tumoren des Großhirns operiert.

10 bis 30 mg des makroskopisch unveränderten Tumorrandgewebes wurden nach der Resektion jeweils mit 1 ml der vorbereiteten Lösungen für 20 min bei 37°C inkubiert. Die Inkubationslösungen waren NaCl, Sterofundin L-5, 100 mg Piracetam/l NaCl und 100 mg Piracetam/l Sterofundin L-5. Sterofundin L-5 (B. Braun Melsungen AG) ist eine in der Therapie häufig verwendete Elektrolytlösung, die die Elektrolyte Natrium, Kalium, Magnesium, Calcium sowie Lactat und Fructose enthält.

Anschließend erfolgte nach dem Homogenisieren und Zentrifugieren der Gewebeteile die Bestimmung von cAMP mit Hilfe der Radioimmunassay-Technik (2). Der Radioimmunassay-Kit für cAMP beruht auf den Grundprinzipien der Reaktion eines Antigens mit seinem spezifischen Antikörper. Als limitierender Faktor wird der Antikörper mit einer Probe gemischt, die das zu bestimmende Antigen und eine bekannte Menge an radioaktivem Antigen enthält. Während einer angemessenen Inkubationszeit bildet sich ein Gleichgewicht zwischen markiertem Antigen - Antikörper - Komplex und unmarkiertem Antigen - Antikörper - Komplex. Endogenes und markiertes Antigen konkurrieren mit denselben aktiven Bindungsstellen an dem Antikörper, und als Ergebnis ist die Menge an gebildetem markierten Komplex umgekehrt proportional zur unmarkierten Antigenkonzentration. Die Konzentration eines Antigens in einer unbekannten Probe wird bestimmt

durch Vergleich mit einer Standardkurve, die dargestellt wird, indem verschiedene bekannte Mengen des Antigens mit der gleichen begrenzten Menge Antikörper und einer konstanten Konzentration von markiertem Antigen reagieren (2).

Der Radioimmunassay von cAMP wurde von STEINER et al. (52) beschrieben. Der Antikörper im Kit wurde bei Kaninchen gegen eine Succinyl - cAMP - Albumin - Verbindung gewonnen und ist spezifisch für cAMP. Das markierte Antigen ist ein cAMP - Derivat, nämlich Succinyl - cAMP - Tyrosin - Methyl - Ester (^{125}J) (2).

Die Trennung des an den Antikörper gebundenen Antigens vom freien Antigen erreicht man durch Ausfällung des Antigen - Antikörper - Komplexes mit Ammoniumsulfat. Nach Zentrifugierung und Dekantierung bestimmt man die gebundene Radioaktivität im Rückstand (den markierten Antigen - Antikörper - Komplex) durch Messen in einem Festkristallszintillationsmeßgerät (2).

Abweichend von der Arbeitsvorschrift des Radioimmunassay - Kit's wurde das Trocknen der wäßrigen Lösung durchgeführt. Ein schnelles Eindampfen konnte durch die Konstruktion einer einfachen Anlage erreicht werden, die von WETH (62) entwickelt wurde. Auf das Reagenzglas, das sich im Wasserbad von 60 bis 70°C befand, wurde ein Gummipfropfen aufgesetzt, der mit einem Glasrohr durchstochen und an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen wurde. Das Problem des Siedeverzuges konnte durch eine Injektionsnadel gelöst werden, die durch den Gummi gestochen wurde.

4. ERGEBNISSE UND STATISTISCHE AUSWERTUNG

4.1. Ergebnisse der cAMP - Konzentrationsbestimmungen

Die cAMP - Konzentrationsbestimmungen im Hirngewebe erbrachten die im folgenden dargestellten Meßwerte:

V1 = Nummer des Gewebes
V2 = Gewebe, inkubiert mit NaCl
V3 = Gewebe, inkubiert mit Sterofundin L-5
V4 = Gewebe, inkubiert mit 100 mg Piracetam/l NaCl
V5 = Gewebe, inkubiert mit 100 mg Piracetam/l Sterofundin L-5

MW = Mittelwert
S = Streuung
SM = Streuung des Mittelwertes

Diese statistischen Parameter ebenso wie die Graphiken und die Rechnungen wurden mit Hilfe des Rechenzentrums der Universität Würzburg erstellt.

V1	V2	V3	V4	V5
1	640	535		1194
2	378	501		535
3	1601	794		772
4	627	2117		2128
5	313	840		1445
6	1366	1179		891
7	724	670	606	1099
8	937	736	1985	1427
9	1713	1645	2435	2233
10	968	452	1395	481
11	1832	618	1822	1058
12	622	369	553	838
13	656	641	808	577
14	1554	1282	1663	1222
15	883	1060	1448	870
16	961	595	1070	1013
17	549	435	693	599
18	1430	1176	1172	1254
19	1880	914	1909	1472
20	1221	2584	3707	2179
21	1998	2245	2577	2873
MW	1088	1018	1589	1245
S	525	633	863	637
SM	114	138	223	139

Tab. 1: Gehalt des Hirngewebes an cAMP (p mol/g)

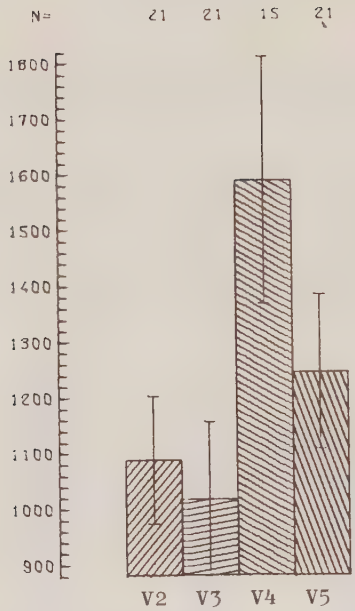


Abb. 1: Mittelwerte mit SM von V2, V3, V4 und V5 (p mol/g)

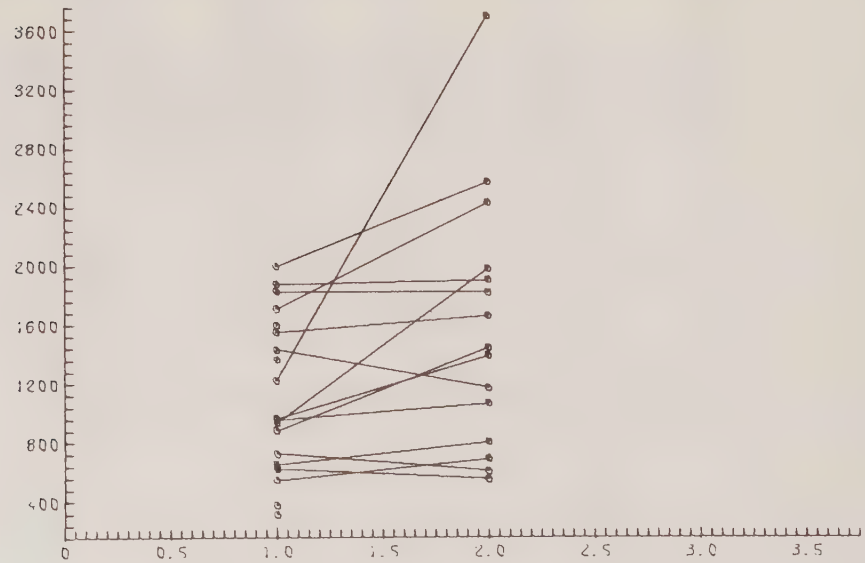


Abb. 2: Graphische Darstellung der Meßwerte von V2 und V4

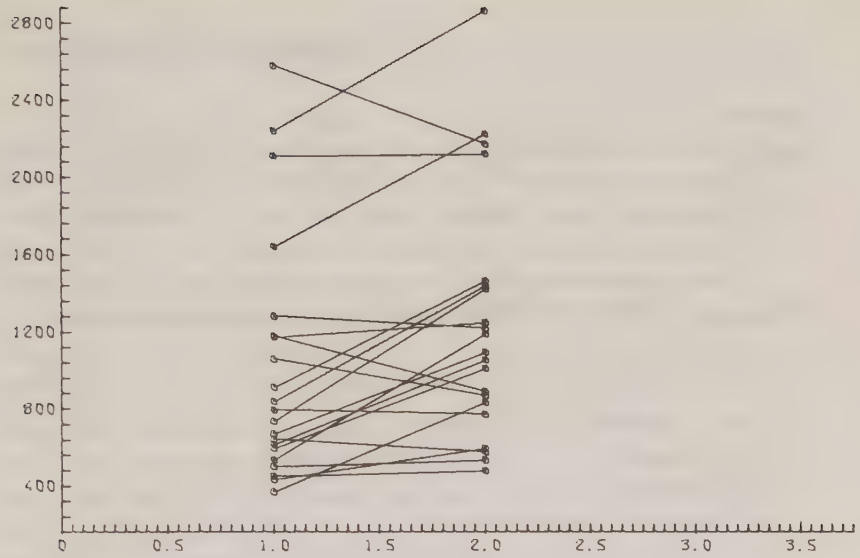


Abb. 3: Graphische Darstellung der Meßwerte von V3 und V5

4.2. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte nach dem t - Test unter Zugrundelegung einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 %. Jedem Meßwert lagen Doppelbestimmungen zugrunde.

Der t - Test dient dazu, festzustellen, ob sich die Mittelwerte μ_1 und μ_2 der Grundgesamtheiten zweier Stichproben signifikant voneinander unterscheiden (42).

Die Werte für den t - Test zeigt Tabelle 2:

Prüfgröße = t

Freiheitsgrad = f

Statistische Sicherheit = P (t)

	t	f	P (t)
V2/V3	0,5	20	0,626
V2/V4	-2,25	14	0,039
V3/V5	-3,04	20	0,006

Tab. 2: t - Test auf Unterschiede von zwei Mittelwerten

5. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Untersuchungsergebnisse über den Einfluß von Piracetam auf den Gehalt an cyclischem AMP in reseziertem menschlichen Hirngewebe zeigen bei mehr als 70 % der Meßserien eine statistisch signifikante Zunahme der cAMP - Konzentration. Darüber hinaus konnte eine unterschiedliche cAMP - Konzentrationsänderung bei den einzelnen Inkubationslösungen beobachtet werden, wobei bei NaCl die Konzentrationen durchschnittlich höher waren als bei Sterofundin L-5.

Ein ähnlicher Effekt wurde von PASTAN und PERLMAN beschrieben (39). Nachdem beobachtet worden war, daß Glucose die Konzentration an cyclischem AMP in E. coli vermindert, konnten diese Autoren zeigen, daß die Zugabe von cAMP zu E. coli die normale Katabolitrepression der Synthese von beta-Galactosidase durch Glucose aufhob. Darauf folgende biochemische und genetische Untersuchungen ergaben, daß das cyclische AMP den Beginn der Transkription vieler induzierbarer Operons stimuliert. Glucose und einige ihrer Derivate hemmen irgendwie die Synthese des cyclischen AMP. Auf welche Weise der Gehalt an cyclischem AMP in den Bakterien durch Glucose auf einem niedrigen Niveau gehalten wird, ist bisher nicht bekannt (33, 39, 54).

Wie aus Tabelle 1 zu ersehen ist, schwanken die Konzentrationen des cyclischen AMP im Hirngewebe erheblich. Eine Reihe von Autoren, die cAMP in tierischem und menschlichem Gewebe untersuchten, unterstreichen ausdrücklich die individuellen Konzentrationsschwankungen (13, 34, 41, 47, 61).

Die Höhe der Nukleotidspiegel in Geweben hängt zum Teil auch ab vom Alter des Patienten, von der Belichtung des Gewebes im Moment der Entnahme, von der Ausprägung des Ödems und der Ischämie, von der Gehirnregion selbst und von der Art der Narkose (34, 47). So nimmt z.B. der Gehalt des Gehirns an cAMP unter einer Äthernarkose signifikant ab (22).

Die in Tabelle 1 und Abbildung 1 dargestellten Meßwerte liegen niedriger als die Konzentrationsangaben, die man in der Literatur bei der Bestimmung von cAMP - Spiegeln im Gehirn findet. Diese Diskrepanz könnte dadurch erklärt werden, daß das Tumorrandgewebe, das für diese Untersuchungen entfernt wurde, nicht sofort, wie in der Literatur angegeben, nach der Resektion in flüssiger Luft eingefroren, sondern mit den genannten Lösungen inkubiert wurde (8, 28).

Die Piracetam - induzierte Steigerung der cAMP - Konzentration im Hirngewebe wird von den biochemischen und pharmakologischen Ergebnissen, die in der Literatur zu finden sind, gestützt.

So wurde unter Piracetam an kortikalen Neuronen und Synaptosomen weißer Kaninchen eine Anregung der synaptosomalen Phospholipase - A_2 - Aktivität um etwa 50 % gemessen. Dieses Phospholipide - spaltende Enzym spielt eine wichtige Rolle bei der synaptischen Erregungsübertragung, indem es die postsynaptische Membrandurchlässigkeit erhöht und die Ionenverschiebungen während der Erregungsübertragung ermöglicht (65). Der Stimulierung der Phospholipase - A_2 - Aktivität geht wahrscheinlich eine Aktivierung des Noradrenalins oder eines anderen Neurotransmitters durch Piracetam voraus (21).

Piracetam stimuliert ferner die Bildung von Äthanolamin - Plasmalogen durch neuronale Mikrosomen und zeigt somit die gleiche Wirkung wie Cytochrom b_5. Die durch Piracetam bewirkte Steigerung der Plasmalogen - Biosynthese konnte durch Zugabe von Anti - Cytochrom b_5 aufgehoben werden. Piracetam greift demnach über eine Steigerung der Synthese oder über einen erhöhten Umsatz von Cytochrom b_5 in die mikrosomale Atmungskette ein (64).

Weitere neurobiochemische Untersuchungen zeigten, daß Piracetam den Einbau von ^{32}P in saure Glycerinphosphatide der Gliazellen und Neurone stimuliert. Unter Berücksichti-

gung der wichtigen Rolle, welche die sauren Glycerinphosphatide bei den Vorgängen der synaptischen Erregungsübertragung und axonalen Erregungsfortleitung spielen, sprechen diese Befunde dafür, daß Piracetam exzitatorische Neurone stimuliert und in den Vorgang der synaptischen Erregungsübertragung eingreift. Der stimulatorische Effekt von Piracetam auf den Einbau von ^{32}P in die sauren Glycerinphosphatide scheint durch Noradrenalin oder einen anderen Neurotransmitter vermittelt zu werden (66).

Durch Piracetam wird offenbar - infolge Steigerung der Enzymaktivität in der Ganglienzelle - der Energiestoffwechsel stimuliert bzw. reaktiviert, also der ATP - Turnover erhöht (20). Diese bioenergetischen Prozesse kommen der Synthese von Neuroproteinen und anderen Makromolekülen zugute, die für die neuronalen Leistungen von großer Bedeutung sind. Rein quantitativ gehören die Nervenzellen ja zu den Spitzenproduzenten von Proteinen (30).

Bei der Interpretation der Erhöhung der cAMP - Konzentration stehen diese biochemischen und pharmakologischen Befunde von Piracetam im Einklang mit den heutigen Kenntnissen über Vorkommen, Bildung, Abbau und Funktion des cyclischen AMP.

So ist das cyclische AMP mitbeteiligt bei der synaptischen Erregungsübertragung (35). Durch das System Adenylcyclase/ Proteinkinase werden Proteine phosphoryliert, was zu einer Konformationsänderung und damit zu einer Änderung ihrer biologischen Aktivität führt. Es wird diskutiert, daß auch Strukturproteine der Zellmembranen Substrat dieser Kinasen sein können, deren Beeinflussung möglicherweise zu Veränderungen der Membranpermeabilität führt (30).

Analog einem Regelkreis kann eine Veränderung an der cAMP-Konzentration sowohl durch eine Änderung der Adenylcyclase - Aktivität als auch durch einen Einfluß auf das Phosphodiesterase - System erreicht werden. Zahlreiche Substanzen können in diesen Regelkreis eingreifen, indem sie durch

eine Beeinflussung der Enzymaktivitäten die Konzentration des cAMP verändern. So erhöhen die Neurotransmitter Noradrenalin, Dopamin, Serotonin und das Nukleosid Adenosin in bestimmten Hirnteilen über eine Stimulierung der Adenylcyclase den cAMP - Gehalt (7, 29, 31, 41). Da das Zerebrum eine durch Noradrenalin stimulierbare Adenylcyclase enthält (8, 16, 17, 29, 49), liegt es nahe, die Piracetam - Effekte auf eine Interferenz mit Noradrenalin oder einen anderen Neurotransmitter zurückzuführen.

Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um den Einfluß von Piracetam auf den zellulären und subzellulären Stoffwechsel zu klären und eine Vorstellung über den Wirkmechanismus dieser Substanz zu entwickeln.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Auf der Suche nach biochemischen Grundlagen der Wirkung von 2-Oxo-pyrrolidin-1-acetamid (Piracetam) wurde der Einfluß der nootropen Substanz auf den Gehalt an cyclischem Adenosin-3',5'-monophosphat (cAMP) in reseziertem menschlichen Hirngewebe untersucht. Cyclisches AMP ist als eine Regulatorsubstanz bei der Wirkung von Hormonen und anderen biologisch aktiven Substanzen und als eine aktive Komponente in vielen Geweben und Spezies anerkannt.

Dabei wurde Tumorrandgewebe, das bei 21 neurochirurgischen Operationen entfernt wurde, mit verschiedenen Lösungen inkubiert und danach der Gehalt des Gehirns an cAMP mit Hilfe der Radioimmunassay-Technik bestimmt.

Die Verabreichung von Piracetam führte zu einer signifikanten Erhöhung des cAMP - Spiegels.

Diese Zunahme der cAMP - Konzentration wird gestützt durch die bekannten biochemischen und pharmakologischen Befunde von Piracetam im Zusammenhang mit den heutigen Kenntnissen über Vorkommen, Bildung, Abbau und Funktion des cyclischen AMP.

Herrn Professor Dr.med. H. FRANKE danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Professor Dr.med. H.-J. PUSCH danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und Arbeitsplatzes.

Herrn Professor Dr.med. K.-A. BUSHE danke ich für die Bereitstellung des Gewebes.

Für die große Hilfsbereitschaft im Labor danke ich Herrn Dr.rer.nat. G. WETH recht herzlich.

Die Rechnungen konnten am Rechenzentrum der Universität Würzburg mit Unterstützung von Frau Dr.rer.nat. I. HAUBITZ durchgeführt werden. Ihr danke ich für die wertvolle Hilfe.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. AANTAA, E., O.H. MEURMAN: The effect of Piracetam upon the late symptoms of patients with skull injuries. J. Int. Med. Res. 3 (1975), 352

2. BECTON, DICKINSON and CO.: Cyclic AMP Radioimmunoassay Kit (^{125}J). Orangeburg, New York (1977)

3. BENTE, D., G. GLATTHAAR, G. ULRICH, M. LEWINSKY: Piracetam und Vigilanz. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 28 (1978), 1529

4. BINDER, S., P. DODDABELA: Die Wirkung von Piracetam auf das geistige Leistungsverhalten chronischer Alkoholiker. Med. Klin. 71 (1976), 711

5. BURNOTTE, R.E., J.G. GOBERT, J.J. TEMMERMAN: Piracetam (2-pyrrolidinone acetamide) induced modifications of the brain polyribosome pattern in ageing rats. Biochem. Pharmacol. 22 (1973), 811

6. BUTCHER, R.W., E.W. SUTHERLAND: Adenosine 3',5'-phosphate in biological materials. J. biol. Chem. 237 (1962), 1244

7. CRAMER, H., J. SCHULTZ: Cyclic 3',5'-nucleotides: Mechanisms of action. John Wiley & Sons, London (1977)

8. DALY, J.W.: Cyclic nucleotides in the nervous system. Plenum Press, New York (1977)

9. DE ROBERTIS, E., G. RODRIGUEZ DE LORES ARNAIZ, M. ALBERICI, R.W. BUTCHER, E.W. SUTHERLAND: Subcellular distribution of adenyl cyclase and cyclic phosphodiesterase in rat brain cortex. J. biol. Chem. 242 (1967), 3487

10. DIMOND, S.J.: Drugs to improve learning performance and verbal registration in man. Manuskript des Vortrages anläßlich des 3rd Congress of the International College of Psychosomatic Medicine, Rome (1975)

11. DOMANSKA - JANIK, K., M. ZALESKA: Action du Piracetam sur le métabolisme du glucose ^{14}C sur des coupes de cortex cérébral chez le rat normal et post-hypoxique. Pol. J. Pharmacol. 29 (1977), 111

12. DORN, M.: Piracetam bei vorzeitiger biologischer Alterung. Doppelblind-Prüfung nach medikamentöser Vorselektion. Fortschr. Med. 96 (1978), 1525

13. DUFFY, M.J., J. WONG, D. POWELL: Stimulation of adenylate cyclase activity in different areas of human brain by substance P. Neuropharmacology 14 (1975), 615

14. FÖRSTER, H., L. LACKO: Physiologische Chemie. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1975)

15. FRATTOLA, L., A. CARENZI, C. CERRI, K. KUMAKURA, M. TRABUCCHI: Regulation of the cyclic guanosine 3'-5' monophosphate system in human brain tumors. Acta Neurol. Scandinav. 54 (1976), 382

16. FUMAGALLI, R., V. BERNAREGGI, F. BERTI, M. TRABUCCHI: Cyclic AMP formation in human brain: An in vitro stimulation by neurotransmitters.
Life Sci. 10 (1971), 1111

17. FURMAN, M.A., K.S. SHULMAN: Cyclic AMP and adenyl cyclase in brain tumors.
J. Neurosurg. 46 (1977), 477

18. GIURGEA, C., D. LEFEVRE, C. LESCRENIER, M. DAVID-REMACLE: Pharmacological protection against hypoxia-induced amnesia in rats.
Psychopharmacologia 20 (1971), 160

19. GIURGEA, C., F. MOURAVIEFF-LESUISSE: Effet facilitateur du Piracetam sur un apprentissage répétitif chez le rat.
J. Pharmacol. 3 (1972), 17

20. GOBERT, J.G.: Genèse d'un médicament: Le Piracetam. Métabolisation et recherche biochimique.
J. Pharm. Belg. 27 (1972), 281

21. GULLIS, R.J., C.E. ROWE: The stimulation by transmitter substances and putative transmitter substances of the net activity of phospholipase A_2 of synaptic membranes of cortex of guinea-pig brain.
Biochem. J. 148 (1975), 197

22. HEIM, F., W. SPRÜGEL, P. MITZNEGG: Der Einfluß einer Äthernarkose auf den Gehalt des Gehirns weißer Mäuse an zyklischen Nukleotiden und der Leber an zyklischen Nukleotiden und Glykogen.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 29 (1979), 1357

23. HERRSCHAFT, H.: Die Wirkung von Piracetam auf die Gehirndurchblutung des Menschen. (Quantitative regionale Hirndurchblutungsmessungen bei der akuten cerebralen Ischämie).
Med. Klin. 73 (1978), 195

24. KAKIUCHI, S., T.W. RALL: Studies on adenosine 3',5'-phosphate in rabbit cerebral cortex.
Mol. Pharmacol. 4 (1968), 379

25. KAKIUCHI, S., T.W. RALL, H. MCILWAIN: The effect of electrical stimulation upon the accumulation of adenosine 3',5'-phosphate in isolated cerebral tissue.
J. Neurochem. 16 (1969), 485

26. KAUFMANN, B.: Schutz und Antrieb für das Hirn.
Selecta 22 (1980), 1194

27. KAUFMANN, B.: Piracetam, eine nootrope Substanz.
Selecta 22 (1980), 4192

28. KEBABIAN, J.W.: Biochemical regulation and physiological significance of cyclic nucleotides in the nervous system.
Adv. Cyclic Nucleotide Res. 8 (1977), 421

29. KODAMA, T., Y. MATSUKADO, H. SHIMIZU: The cyclic AMP system of human brain.
Brain Research 50 (1973), 135

30. KREUTZBERG, G.W.: Aspekte der Zellbiologie und Zellpathologie des Neurons.
Aesopus Verlag GmbH, Lugano (1975)

31. KRISHNA, G., J. FORN, K. VOIGT, M. PAUL, G.L. GESSA: In "Role of cyclic AMP in cell function" (Eds. Greengard, P. and E. Costa) Raven Press, New York (1970), 155

32. LAGERGREN, K., S. LEVANDER: A double-blind study on the effects of Piracetam upon perceptual and psychomotor performance at varied heart rates in patients treated with artificial pacemakers. Psychopharmacologia 39 (1974), 97

33. LEHNINGER, A.L.: Biochemistry. Worth Publishers, Inc., New York (1975)

34. MEL'NICHUK, P.V., T.E. SHMIDT, V.K. MALAKHOVSKI'I, L.I. LEVCHENKO: Izmenenie urovnia tsiklicheskikh nukleotidov v opukholiakh golovnogo mozga. Zh. Nevropatol. Psikhiatr. 78 (1978), 1182

35. NATHANSON, J.A.: Cyclic nucleotides and nervous system function. Physiol. Rev. 57 (1977), 157

36. OSTROWSKI, J., M. KEIL, E. SCHRAVEN: Autoradiographische Untersuchungen zur Verteilung von Piracetam-^{14}C bei Ratte und Hund. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 25 (1975), 589

37. OSTROWSKI, J., M. KEIL: Autoradiographische Untersuchungen zur Verteilung von ^{14}C-Piracetam im Affengehirn. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 28 (1978), 29

38. PARRISIUS, H.W.: Doppelblindstudie mit Piracetam in der Geriatrie. Geriatrie 7 (1977), 32

39. PASTAN, I., R. PERLMAN: Cyclic adenosine monophosphate in bacteria.
Science 169 (1970), 339

40. PLATT, D., H. HERING, F.J. HERING: Messungen lysosomaler Enzym-Aktivitäten sowie von Leuzin-Inkorporationsraten im Gehirn junger und alter Ratten nach Gabe von Piracetam.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 24 (1974), 1588

41. RALL, T.W., A. SATTIN: In "Role of cyclic AMP in cell function" (Eds. Greengard, P. and E. Costa)
Raven Press, New York (1971), 113

42. RAMM, B., G. HOFMANN: Biomathematik und medizinische Statistik.
Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart (1976)

43. RICHARDSON, A.E., F.J. BEREEN: Effect of Piracetam on level of consciousness after neurosurgery.
Lancet II (1977), 1110

44. ROBISON, G.A., R.W. BUTCHER, E.W. SUTHERLAND: Cyclic AMP.
Academic Press, New York and London (1971)

45. SATTIN, A., T.W. RALL: The effect of adenosine and adenine nucleotides on the cyclic adenosine 3',5'-phosphate content of guinea-pig cerebral cortex slices.
Mol. Pharmacol. 6 (1970), 13

46. SCHILLER, E.: Elektronenmikroskopische und mikrointerferometrische Beiträge zum Wirkungsmechanismus von Piracetam.
Verh. Dtsch. Ges. Path. 58 (1974), 578

47. SHMIDT, T.E., L.I. LEVCHENKO: Narushenie obmena tsiklicheskikh nukleotidov v opukholiakh golovnogo mozga.
Zh. Vopr. Neirokhir. 3 (1979), 39

48. SCHULTE AM ESCH, J., G. PFEIFER: Vorläufige Erfahrungen mit Piracetam in der Intensivtherapie schwerer Schädel-Hirn-Verletzungen.
Med. Klin. 69 (1974), 1235

49. SHIMIZU, H., S. TANAKA, T. SUZUKI, Y. MATSUKADO: The response of human cerebrum adenyl cyclase to biogenic amines.
J. Neurochem. 18 (1971), 1157

50. SIGGINS, G.R., B.J. HOFFER, F.E. BLOOM: Cyclic adenosine monophosphate: Possible mediator for norepinephrine effects on cerebellar Purkinje cell.
Science 165 (1969), 1018

51. STEGINK, A.J.: The clinical use of Piracetam, a new nootropic drug.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 22 (1972), 975

52. STEINER, A.L., D.M. KIPNIS, R. UTIGER, C. PARKER: Radioimmunoassay for the measurement of adenosine 3',5'-cyclic phosphate.
Proc. Nat. Acad. Sci. 64 (1969), 367

53. STREHL, W., A. BROSSWITZ: Klinische Beobachtungen über die Wirkung von Piracetam auf einige Hirnfunktionen bei Schulkindern im doppelten Blindversuch.
Therap.woche 22 (1972), 2975

54. STRYER, L.: Biochemistry.
W.H. Freeman and Co., San Francisco (1975)

55. SUTHERLAND, E.W., T.W. RALL, T. MENON: Adenyl cyclase. J. biol. Chem. 237 (1962), 1220

56. SUTHERLAND, E.W., G.A. ROBISON, R.W. BUTCHER: Some aspects of the biological role of adenosine 3',5'-monophosphate (Cyclic AMP). Circulation 37 (1968), 279

57. THIEBAULD, CH.: Improvement of intellectual performance contribution of a specific cortical therapy. Vortrag anläßlich des 38. Kongresses französisch sprechender Mediziner, Beirut (1971)

58. ULBRICHT, B.: Über die klinische Anwendung von Piracetam bei chronischem Alkoholismus und dessen Komplikationen Prädelir und Delir. Med. Welt 27 (N.F.) (1976), 1912

59. VIALATTE, J.: Expérimentation clinique chez l'enfant du Piracetam. Vie Médicale 18 (1973), 2327

60. WEDL, W., R.M.A. SUCHENWIRTH: Eigenwirkungen des GABA-Abkömmlings Piracetam im doppelten Blindversuch bei gesunden Probanden. Nervenarzt 48 (1977), 58

61. WEISS, B., S.J. STRADA: Neuroendocrine control of the cyclic AMP system of brain and pineal gland. Adv. Cyclic Nucleotide Res. 1 (1972), 357

62. WETH, G.: Persönliche Mitteilung. Würzburg (1981)

63. WOELK, H.: Neurobiochemische und neurophysiologische Grundlagen der Piracetam-Wirkung. Vortrag auf der 22. Jahrestagung der Deutschen EEG-Gesellschaft, Frankfurt (1977)

64. WOELK, H., K. PEILER-ICHIKAWA: The action of Piracetam on the formation of ethanolamine-plasmalogen by neuronal microsomes of the developing rat brain.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 28 (1978), 1752

65. WOELK, H.: Zum Einfluß von Piracetam auf die neuronale und synaptosomale Phospholipase - A_2 - Aktivität.
Arzneim.-Forsch./Drug Res. 29 (1979), 615

66. WOELK, H.: Effects of Piracetam in the incorporation of ^{32}P into the phospholipids of neurons and glial cells isolated from rabbit cerebral cortex.
Pharmakopsychiat. 12 (1979), 251

67. WOLTHUIS, O.L., V.J. NICKOLSON: Piracetam and acquisition behaviour in rats: Electro-physiological and biochemical effects.
Paper read at 3rd Cong. Int. College Psychosomatic Medicine, Rome (1975)

L e b e n s l a u f

Am 15. Februar 1954 wurde ich, Rudolf Fritsch, als Sohn des Betriebsinspektors Eduard Fritsch und seiner Ehefrau Luzia, geborene Becker, in Rothenbuch, Kreis Lohr am Main, geboren.

August 1960 bis Oktober 1963	Volksschule Rothenbuch
November 1963 bis Juli 1964	Volksschule Burgebrach, Kreis Bamberg
September 1964 bis Juni 1973	Franz-Ludwig-Gymnasium Bamberg
8. Juni 1973	Abitur
Oktober 1973 bis Oktober 1979	Medizinstudium an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
30. Oktober 1979	Ärztliche Prüfung
1973 und 1980	Wehrdienst

Rudolf Fritsch

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80